

# PROCESS FOR EXTRACTING PURE FRACTIONS OF LACTOPEROXIDASE AND LACTOFERRIN FROM MILK SERUM

Publication number: JP3502921T

Publication date: 1991-07-04

Inventor:

Applicant:

Classification:

- international: A23C9/142; A23C9/146; A23J1/20; A23C9/00;  
A23J1/00; (IPC1-7): C07K3/22; C07K3/26; C07K15/14;  
C12N9/08

- european: A23C9/142C; A23C9/146B; A23J1/20C

Application number: JP19880509492T 19881125

Priority number(s): SE19870004719 19871127

Also published as:

- W O8904608 (A1)
- E P0390821 (A1)
- US 5149647 (A1)
- E P0390821 (A0)
- DK 124590 (A)

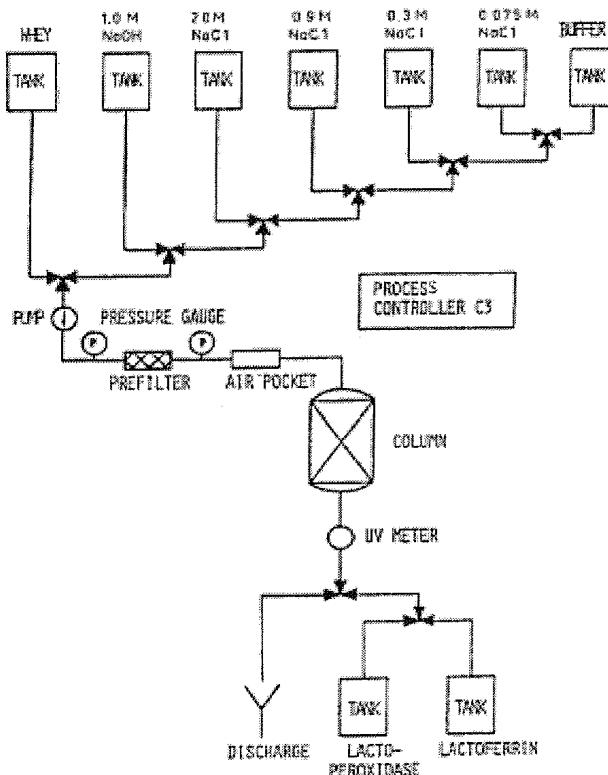
[more >>](#)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP3502921T

Abstract of corresponding document: **US5149647**

PCT No. PCT/SE88/00643 Sec. 371 Date May 24, 1990 Sec. 102(e) Date May 24, 1990 PCT Filed Nov. 25, 1988 PCT Pub. No. WO89/04608 PCT Pub. Date Jun. 1, 1989. A process for extracting pure fractions of lactoperoxidase and lactoferrin from milk serum is described. The milk serum is microfiltered and passed through a strong cation exchanger at a high rate of flow for selective adsorption of lactoperoxidase and lactoferrin, and then the lactoperoxidase and lactoferrin are eluted successively and selectively with saline solutions having different concentrations.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑯ 日本国特許庁 (JP)

⑮ 特許出願公表

## ⑯ 公表特許公報 (A)

平3-502921

⑰ 公表 平成3年(1991)7月4日

⑯ Int.Cl.<sup>5</sup>  
 C 07 K 15/14  
 3/22  
 3/26  
 C 12 N 9/08

識別記号

府内整理番号  
8619-4H審査請求未請求  
予備審査請求有

部門(区分) 3(2)

7823-4B

(全6頁)

⑯ 発明の名称 乳清からのラクトペルオキシダーゼおよびラクトフェリンの純粋な画分の抽出法

⑯ 特願 昭63-509492

⑯ 翻訳文提出日 平2(1990)5月28日

⑯ ⑯ 出願 昭63(1988)11月25日

⑯ 国際出願 PCT/SE88/00643

⑯ 国際公開番号 WO89/04608

⑯ 国際公開日 平1(1989)6月1日

優先権主張 ⑯ 1987年11月27日 ⑯ スウェーデン(SE) ⑯ 8704719-7

⑯ 発明者 ブルリング、ハンス スエーデン国ルンド、ヘブデインガベーゲン、15

⑯ 出願人 スベンスカ、メリエリールナ スエーデン国ストックホルム、ボックス、24  
ス、リクスフエレニングス、エ  
コノミー・アクチエボラーグ

⑯ 代理人 弁理士 佐藤 一雄 外2名

⑯ 指定国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C H(広域特許), D E(広域特許), D K, F I, F R(広域特許), G B  
(広域特許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), N O, S E(広域特許), U S

## 請求の範囲

くは0.4~1.5 μmのマイクロフィルターで行う、請求の範囲第1項~第5項のいずれか1項に記載の方法。

7. 塩溶液で溶出したラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンをそれぞれ濃縮し、脱塩し、凍結乾燥する、請求の範囲第1項~第6項のいずれか1項に記載の方法。

1. 乳清からのラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンの純粋な画分を抽出する方法であって、乳清をマイクロ濾過し、これをラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンを選択的に吸着させるため高流量で強陽イオン交換体を通過させた後、異なる濃度の塩溶液でラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンを逆続的且つ選択的に溶出させることを特徴とする方法。

2. ラクトペルオキシダーゼを、pHが約6.5で濃度が0.10~0.4Mの塩溶液で選択的に溶出する、請求の範囲第1項に記載の方法。

3. ラクトフェリンを、濃度が0.5~2Mの塩溶液で選択的に溶出する、請求の範囲第1項または第2項に記載の方法。

4. ラクトペルオキシダーゼを溶出する前に、陽イオン交換体を濃度が0.01~0.15Mの塩溶液、好ましくは無機アルカリ、アルカリ土類またはアンモニウム塩の溶液で溶出する、請求の範囲第1項~第3項のいずれか1項に記載の方法。

5. 乳清のpHを5.8~9.0、好ましくは約6.5に調整した後、陽イオン交換体を通過させる、請求の範囲第1~4項のいずれか1項に記載の方法。

6. マイクロ濾過を、細孔度が0.10~2 μm、好まし

## 明細書

乳清からのラクトベルオキシダーゼおよび  
ラクトフェリンの純粋な画分の抽出法

本発明は、乳清からのラクトベルオキシダーゼおよびラクトフェリンの純粋な画分の抽出法に関する。乳清とはスキムミルクとホエーの両者を意味する。

チーズの製造では、多量のホエーが副生成物として得られる。ホエーの乾燥固体物含量は約6%であり、ほぼ下記のようなものから構成されている。

	質量%
ラクトース	4.6
タン白質	0.6、その中の
ラクトベルオキシダーゼ	0.0020
ラクトフェリン	0.0030
脂肪	0.05(分離後)
塩	0.7
固体物含量	約8.0

乾燥固体物含量の約10~12%を構成するタン白質画分は、多数の異なるタン白質成分から成っている。最大のものは、 $\beta$ -ラクトグロブリン、 $\alpha$ -ラクトアルブミンおよびウシ血清アルブミンである。多数の生物活性成分も、タン白質画分に属し、例えば免疫グロブリン、ラク

## 特表平3-502921(2)

トベルオキシダーゼ、ラクトフェリンおよびリゾチームである。

ラクトベルオキシダーゼとラクトフェリンは、抗菌活性を有する。食品技術における新たな情況においておよび化学技術や医学の分野で用いられる天然の抗菌性物質の抽出に大きな関心が持たれている。

スキムミルクとホエーでは(および元のミルクでは)これらの物質の含量は低い。ラクトベルオキシダーゼとラクトフェリンの含量は、ウシの授乳状態によって変わるが、15~60mg/リットルで含まれる。したがって、これらの生物活性成分をキログラムの量で抽出し易くするには、多量のホエー(ミルク)を濾過しなければならない。

ミルク/ホエーからラクトベルオキシダーゼとラクトフェリンをそれぞれ単離するためのプロセス工学条件は、これら2種類のタン白質の等電点(pI)が約9.5であるが、ホエータン白質の主要部分の等電点は約6.1~6.4であり、カゼインの等電点は約4.8であるという事実に基づいている。それ故、ラクトベルオキシダーゼとラクトフェリンを分離するに基本的に好適な方法は、ミルク/ホエーをpH<6で陽イオン交換体と接触させて選択的に吸着させることであり、この場合に、ラクトベルオキシダーゼとラクトフェリンとの真の正電荷を用いてこのpHで陰電荷を有する他のミルクタン白質と区

別するのである。

研究のために少量でラクトベルオキシダーゼとラクトフェリンを単離する伝統的な方法は、しばしばゲル通過と組み合わせて使用される沈降法およびイオン交換クロマトグラフィを用いる方法であり、モリソン、エム(Morrison, M.)、ハミルトン、エイチ・ピー(Hamilton, H-B.)、シュトツ、イー(Stotz, E.)、J. Biol. Chem., 228: 767 (1957); モリソン、エム(Morrison, M.)、フルトクィスト、ピー・イー(Hultquist, P-E.)、J. Biol. Chem., 238: 2847 (1963)を参照されたい。これらの方法は、経済的に確証し得る程度に前記の生物活性を有する成分を多量に調製するのには適さない。

米国特許第4,438,658号明細書(ペヴロスセット(Povrosuset))には、シリカカラムによるカゼイン不含乳清(ホエー)からのラクトフェリンの吸着が開示されている。乳清のpHを7.1~8.2に調整した後、カラムに吸着させるのである。免疫グロブリン、ラクトフェリンおよびラクトベルオキシダーゼがカラムに付着する。吸着工程の後に、pH<4の希釈した塩溶液で溶出を行う。吸着したタン白質は、特にラクトベルオキシダーゼに関しては選択的に溶出しない。約5gのシリカを保持するカラムでは、ホエー1リットルを処理することができる。この先行技術による方法は、工業的規模での適用には適さないものと考えねばならない。

ザグルスキイ(Zagulski)らは、Prace In materialy Zootechniczne, 20, (1979), 87~103頁にラクトフェリンを得るパッチ法であって、弱陽イオン交換体を用いてこれをミルクと混合する方法を記載している。平衡に達したならば、イオン交換体をカラムに入れて、吸着したタン白質を塩溶液で溶出させるのである。したがって、この方法はパッチ法に基づいており、高純度のラクトフェリンを得るには第二のイオン交換工程で更に精製を行わなければならない。

同様な方法はベルギー国特許第901,672号明細書(ジェイ・ピー・ブリールス(J.P. Prieels)とアール・ペイパー(R. Peipper)、オレフィナ・エス・エイ(Olefina S.A.)に記載されている。この方法では、アルギン酸カルシウムを基剤とするイオン交換体であって、イオン交換官能価をジルコニウム、チタン、石英またはアルミニウムの酸化物の添加によって得たものが用いられる。ミルク/ホエーを充填カラム中でイオン交換体と接触させ、またはタンク中で混合することによって、等電点が7.5より高いタン白質を吸着させる。平衡に達したならば、ゲルを機械的に分離して洗浄装置に供給し、塩化カルシウム溶液で溶出させる。アルギン酸カルシウムと接触する他の流体は少なくとも0.1%のCaCl<sub>2</sub>を含み、ゲルが溶解するのを防止するものでなければならぬ。ラクトベルオキシダーゼとラクトフェリンはこの溶

### 特表平3-502921(3)

ホエー／スキムミルクからラクトベルオキシダーゼとラクトフェリンを経済的に回収するには、工業的に適用可能な方法に次のような要件を与えることができる。

- (1) 吸着マスの選択的処理能力が高い。ラクトベルオキシダーゼ／ラクトフェリンの乳清中での含量は低いので、1回の溶出で処理することができる乳清の容積は大きくなければならない。
- (2) 吸着相における流量が高い。(通常のクロマトグラフィ法では低速、0.01~0.10床容積／分で処理するのが普通である)。この理由は、粒度が小さいため、床は通常は圧降下が大きく、吸着法の反応速度には流量を高くする必要があることがしばしばあるからである。
- (3) この方法は衛生的でなければならず、これは吸着マスは少なくともpH13~14の灰汁で処理しなければならないことを意味する。

本発明の目的は、乳清(ホエー)からラクトベルオキシダーゼとラクトフェリンの純粋な画分を抽出するための前記の要件を満足する方法を得ることである。

本発明は、乳清からのラクトベルオキシダーゼとラクトフェリンの純粋な画分を抽出する方法に関し、この方法は乳清をマイクロ滤過し、これを高流量で強陽イオン交換体を通過させ、ラクトベルオキシダーゼとラクトフェリンを純なる濃度を有する塩溶液で選択的に逆流的に

出では分別されないが、別の精製工程で分別を行わなければならない。

カラム法で商業的に確立されたイオン交換法で処理されない理由として、前記のベルギー国特許明細書は、媒質中に球状の脂肪とタン白質の凝聚体の粒子が発生することによってイオン交換体の目詰りを生じるという克服し難い問題点を挙げている。

英國特許第B.179,947号明細書には、ミルクからのラクトransフェリン抽出法が開示されている。この方法を行って、ホエーに限外滤過を施すことによって(ラクトtransフェリンを含有する)ホエーのタン白質含量を約5倍に濃縮した後、そのpHとイオン強度を調節するようにする。こうして処理された乳清を非常に低速度(約0.03床容積／分)でイオン交換カラム、好ましくは弱陽イオン交換体を通過させる。このカラムを、ラクトフェリンが溶出されるときに0.4Mまで増加するイオン強度勾配を有する溶液で低速度で溶出させる。これは小規模法であり、ラクトフェリンを工業的な製造には適さない。弱陽イオン交換体を使用することによって、容量が低くなる。天然の乾燥固体物含量に転換された100床容積の量のホエーを、それぞれの溶出の間にイオン交換カラムを通過させることができる。脂肪とタン白質粒子によって生じるイオン交換フィルターの目詰りの問題は、この先行技術法によっては解決されてはいない。

溶出させることを特徴とする。

本発明によれば、単一のイオン交換工程で2種類の異なる血清タン白質の純粋な画分を調製する方法が提供される。これは、以前は工業的規模では行われていなかったものである。先行技術による工業的規模でこれらのタン白質を抽出する方法では、2または3の精製工程を必要とした。

血清またはホエー中に球状脂肪およびタン白質凝聚体のような粒子の生成によって起こるイオン交換体の目詰りの上記の問題は、乳清(ホエー)をマイクロ滤過(例えばいわゆる十字流滤過法)した後、イオン交換床に接触させる本発明によって解決される。マイクロフィルターの好適な細孔度を選択することによって、目詰りを引き起こす脂肪とタン白質の凝聚体粒子を除去することができる。好適なマイクロフィルターの細孔直徑は0.10~2μm、好ましくは0.4~1.5μmである。

本発明による方法の出発材料としては、乳清(ホエー)すなわち脂肪とカゼインを除いたミルクが用いられる。乳清を最初にマイクロ滤過によって処理して、脂肪とタン白質凝聚体粒子の残渣をいわゆる十字流法で除去する。マイクロ滤過を行った乳清を、次に高速(約1~1.5床容積／分)で強陽イオン交換体であって、ラクトベルオキシダーゼとラクトフェリンを選択的に吸着するものを充填したカラムを通過させる。この船イオン交換体は、

優れた速度および吸着速度特性と、乳清の約1000床の容量を有する。これは、最も弱く結合しているラクトベルオキシダーゼが漏出する、すなわちイオン交換マスがこれらのタン白質で飽和されるまでに約1000床容積の乳清が通過できることを意味する。吸着相の初めと終りとの間には、圧降下は極僅かしか増加しない。

イオン交換マスの溶出は、乳清をカラムから緩衝液、好ましくは乳清のpH8.5のリン酸緩衝液で洗い出すことによって開始する。次いで、不純物があるとすればこれが、好ましくは無機アルカリ、アルカリ土類またはアンモニウム塩の弱塩溶液、例えば0.075M NaClを含む緩衝液で溶出する。

この予備的溶出の後、所望のタン白質を、異なる濃度で前記の塩から選択される塩溶液を含む緩衝液で選択的に溶出する。例えば、ラクトベルオキシダーゼの溶出を0.10~0.4Mの範囲の塩濃度で行い、ラクトフェリンの溶出を0.5~2Mの塩濃度で行う。

この処理の後、関連のタン白質を約500倍に濃縮した。純粋なタン白質画分を集めた後、好ましくは限外滤過の後に脱塩および凍結乾燥を行うことによって更に濃縮して、純粋なタン白質画分が約90%である商業製品を得るようにする。

1kgのラクトベルオキシダーゼと1kgのラクトフェリンを製造するためには、それぞれ約85および45gのホエー

特表平3-502921 (4)

ーが必要である。抽出した成分の純度は90%を上回る。これはイオン交換体を適当に選択し、pHおよび塩濃度が重要なパラメーターである吸着および溶出条件を慎重に選択することによって得られる。

本発明を下記の実施例と添付の図面によって詳細に説明する。

第1図は、本発明による方法の好ましい態様の模式図であり、

第2図は、イオン交換カラムからラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンを溶出すると旨の紫外線吸収スペクトルを表わし、

第3図は、本発明による分別を行った後のラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンの純度を示すクロマトグラムである。

実施例

pH 6.5で殺菌しスラッジを遠心分離したスイートホエー100リットルを、50°Cで十字流法でマイクロ滤過した。マイクロ滤過によって、粒状の脂肪の残っている残渣を、生成するタン白質凝集体と共に除去した。マイクロフィルターの細孔度は1.4 μmであった。

冷却した後、ホエーを、アガロースを基剤とする特別の処理した強陽イオン交換体(S-セファロース、急流、ファルマシア(Pharmacia) ) 80mlを充填したイオン交換カラムを通過させた。床の高さ約4.1 cmであり、カラム

中の流量は100 ml/分であり、1.25床容積/分の流量に相当した。実験の開始時におけるカラムの前の圧降下は0.28バールであった。15時間後に、流量は0.28バールの圧降下で100 ml/分であった。ホエー約80~90リットルがカラムを通過したときラクトペルオキシダーゼの漏出が起り、すなわち約1000床容積であった。

次に、ホエーの流れを遮り、溶出相をリン酸緩衝液0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH 6.5でカラムからのホエーを洗浄し、0.075 M NaClを含むリン酸緩衝液で不純物をイオン交換体から溶出させることによって開始した(第1図)。ラクトペルオキシダーゼを0.8 M NaClを含むリン酸緩衝液で溶出した後、ラクトフェリンを0.8 M NaClを含むリン酸緩衝液で溶出させた(第2図参照)。

画分を集めめた後、集めた画分をセファデックスカラム中でゲル滤過によって脱塩し、最後に凍結乾燥した。

イオン交換カラムを、最初に2.0 M NaClで洗浄した後、1.0 M NaOHで洗浄することによって清掃した後、カラムを再び実験に用いた。

イオン交換後のラクトペル

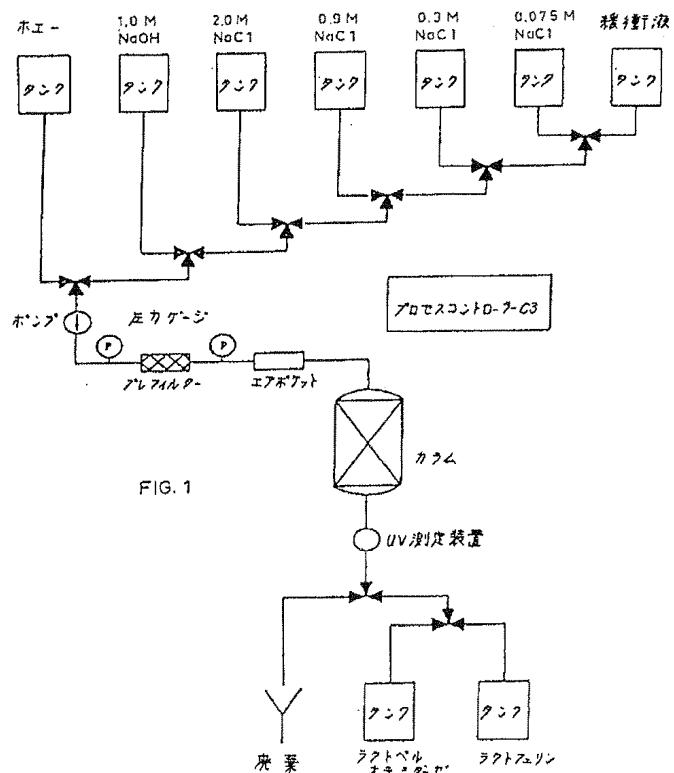
オキシダーゼの収率: 98.5%

溶出後に捺められた画分の

純度:  $A_{412}/A_{280} = 0.84^*$

活性として計算した凍結乾燥

後の方針における純度: 90%  
凍結乾燥した調製物の純度:  $A_{412}/A_{280} = 0.87^*$   
\* 0.92が100%の純度に対応する最大値である。  
対応する収率と純度をラクトフェリンについて得た  
(第3図参照)。



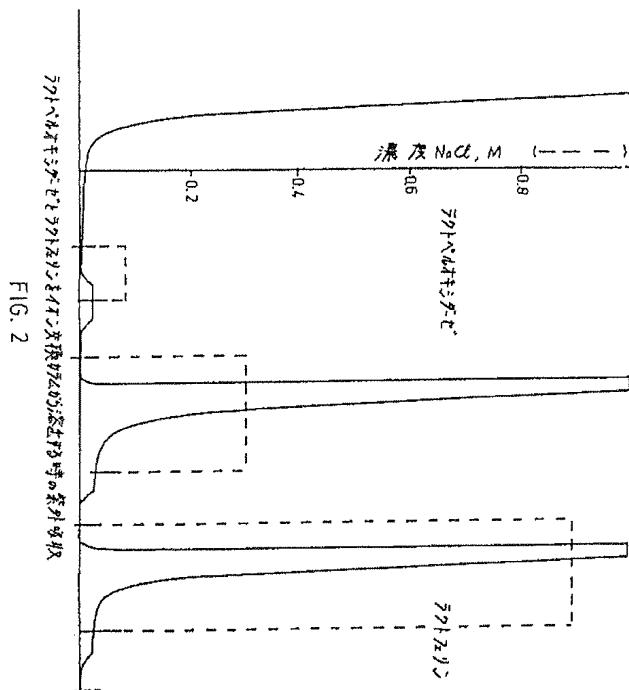
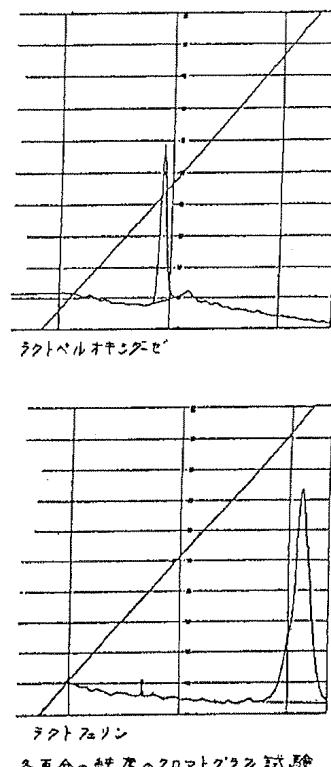


FIG. 2



各画分の純度のクロマトグラム試験

## 補正書の翻訳文提出書（特許法第184条の7第1項）

平成2年5月28日

特許庁長官 吉田文毅 殿

## 1. 特許出願の表示

PCT/SE 88/00643

## 2. 発明の名称

乳清からのラクトペルオキシダーゼおよび  
ラクトフェリンの純粋な画分の抽出法

## 3. 特許出願人

住所 スエーデン国ストックホルム、ボックス、24

名 称 スベンスカ、メリリールナス、リクスフェレニングス、  
エコノミー・アクチエボラーグ

## 4. 代 理 人

(郵便番号 100)  
東京都千代田区丸の内三丁目2番3号  
(電話東京(03)2321大代表)  
8428 井理士 佐藤一

## 5. 補正書の提出年月日

1990年4月15日

## 6. 添付書類の目録

(1) 補正書の翻訳文

1通

添附の請求の範囲はすべて補正されたものであり、国際出願時の請求の範囲第6項、第7項は削除されております。

## 請求の範囲

1. 乳清からのラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンの純粋な画分を抽出する方法であって、乳清をマイクロ滤過し、これをラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンを選択的に吸着させるため約1～1.5 床容積/分の高流量で強陽イオン交換体の床中を通してさせた後、pHが約8.5で濃度が0.10～0.4 Mの塩溶液でラクトペルオキシダーゼを、濃度が0.5～2 Mの塩溶液でラクトフェリンを、連続的且つ選択的に溶出させることを特徴とする方法。

2. ラクトペルオキシダーゼを溶出する前に、陽イオン交換体を濃度が0.01～0.15 Mの塩溶液、好ましくは無機アルカリ、アルカリ土類またはアンモニウム塩の溶液で溶出する、請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 乳清のpHを5.9～9.0、好ましくは約8.5に調整した後、陽イオン交換体を通過させる、請求の範囲第1項または第4項に記載の方法。

4. マイクロ滤過を、細孔直径が0.10～2 μm、好ましくは0.4～1.5 μmのマイクロフィルターで行う、請求の範囲第1項～第3項のいずれか1項に記載の方法。

5. 塩溶液で溶出したラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンをそれぞれ濃縮し、脱塩し、凍結乾燥する、請求の範囲第1項～第4項のいずれか1項に記載の方法。

国際調査報告

International Application No. PCT/SCB8/00643

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Classification No. 123 C 9/146
Assignee in International Patent Classification (IPC) or in both National Classification and IPC		
A 23 J 1/20; C 07 K 3/28; C 12 C 9/08; A 23 C 9/146		
II. FIELDS SEARCHED		Minimum Documentation Searched
Classification System		
IPC 4 A 23 C 9/14 - /148; A 23 J 1/20; C 07 K 3/20 - /28; C 07 K 15/14; C 12 N 9/08		
Documentation Services used in Minimum Documentation is the extent that such Documentation is included in the Fields Searching?		
SE, NO, DK, II classes as above. Data base: Anechi, WPI/L, claims, CA.		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Criteria for Document(s) with Molecule, where appropriate, claim number(s) if applicable
Y GB, A: 2,179,947 (ROUSSEL-UCLAF) 1-7 18 March 1987 & BE, 905087 FR, 2584727 DE, 3623474 JP, 62019523 SE, 8602877 NL, 8601814 LU, 86508 CH, 668428		
Y US, A: 3,896,241 (THE COCA-COLA COMPANY) 1-7 22 July 1975 & NL, 7211742 FR, 2151042 DE, 2243189 BE, 788120 GB, 1403086 CH, 563123 AU, 439239 CA, 991010		
<small>C. Several references of cited documents:</small> "A" document defining the general state of the art which is not considered to contain sufficient disclosure for the claimed invention. "B" document published on or after the international filing date. "C" document which may (from either claims or abstract) be cited to establish the publication date of another document. "D" document relating to an oral disclosure, via, for example, of a technical report or a patent application. "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date.		
<small>F. Several references of cited documents:</small> "F" later document published after the international filing date or priority date and on or before the publication date of another document which may be cited to establish the publication date of that other document. "G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to have involved an inventive step if it is disclosed in this document. "H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to have involved an inventive step if it is disclosed in this document and one or more other such documents which considerably body depend on or form part of the art. "I" document member of the same patent family.		
IV. CERTIFICATION		Date of the Actual Completion of the International Search
1989-02-06		Date of filing of this International Search Report
International Searching Authority		Signature of Authorized Person
Swedish Patent Office		Yvonne Blomqvist

Form PCT/ISA/WP (Form 16/80) (January 1988)

International Application No. PCT/SCB8/00643

II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Examiner's Name: Criteria for Document with molecule, where appropriate, of the Additional Passages Reference to Claim No.		
Y US, A: 4,436,658 (SOCIETE NATIONALE ELF AQUITAINE) 1-7 13 MARCH 1984 & GB, 2,058,998 FR, 2,215,155 DE, 323,8348 BE, 893,156 NL, 820,1947 SE, 820,3056 JP, 580,28233 CA, 1,171,723 CH, 650,905 AU, 557,353		
Y Rev. from Biochim 21, 2, 1984, Bustia et al "The simultaneous preparation of the active components from human milk" P 81-91		
Y Chemical abstracts, Vol 105, 1986, Abstract no 41350u, J Chromatogr., 1986, 358(2), 429-33(Eng) 1-7		

Form PCT/ISA/WP (Form 16/80) (January 1988)

International Application No. PCT/SCB8/00643

V. FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET	
II. Fields searched (cont.)	
US Cl 260,112,122,123; 435,192	
<input type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE: This International search report has not been established in respect of claim(s) when claim 110 is not the main claim requested. <input type="checkbox"/> Claim numbers ..... because they must be subject matter required to be searched by the Authority, namely:	
<input type="checkbox"/> CLAIM AUTHORITY ..... because there fails to exist at the international application (II) of the applicant with the prescribed requirements in such an extent that the International Search Report can be effective for examination.	
<input type="checkbox"/> CLAIM NUMBER ..... because they are dependent claims and are not cited in accordance with the priority and their numbers of PCT Rule 4.1(1)	
<input type="checkbox"/> OBSERVATION WHERE UNIT OF INVENTION IS LACKING: This International Searching Authority found multiple inventions in the International application as follows:	
<input type="checkbox"/> A) An International Search Report was filed by the applicant, this International search report covers all inventions claimed in the International application. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were paid by the applicant, this International search report covers only those claims of the International application for which fees were paid, specifically claims:	
<input type="checkbox"/> No required additional search fees were paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claim(s) it is directed by claim numbers:	
<small>① A) An International Search Report could be submitted without often specifying an examiner for the International Searching Authority did not receive payment of any examination fee.</small> <small>② The International search fees were determined by applicant's request.</small> <small>③ No amount accompanying the payment of additional search fees.</small>	

Form PCT/ISA/WP (Form 16/80) (January 1988)